



Pima™ CD4 Cartridge - Manuel d'utilisation

Français

Pour l'assistance technique, contacter le distributeur local ou appeler l'un des numéros indiqués ci-après:

Europe: +44 161 483 9032 EMEproductsupport@alere.com
Afrique: +27 21 5315 999
Asie Pacifique: +61 7 3363 7166
Amérique latine: +57 2 6618916, +57 2 6618797 la.techsupport@alere.com
Indes: +91 11 45089400

Alere Technologies GmbH Löbstedter Str. 103–105 D-07749 Jena Allemagne www.pimatest.com

Indication

Le Pima CD4 est un test automatisé d'analyse sanguine des défenses immunitaires par imagerie destiné à la mesure quantitative in vitro rapide des lymphocytes T CD3+/CD4+ (lymphocytes T-auxiliaires) dans le sang total veineux ou capillaire. Le Pima CD4 détermine le comptage absolu de cellules CD3+/CD4+ et est conçu afin de surveiller en continu le comptage absolu des lymphocytes CD4 chez les patients atteints d'une immunodéficience.
Le Pima CD4 test est conçu pour un usage diagnostique in vitro.

Introduction

La concentration en lymphocytes T-auxiliaires est un indicateur de l'immunité du patient et on sait que le comptage absolu de lymphocytes T-auxiliaires décroît chez les patients immunodéficients. L'évolution des nombres absolus de lymphocytes T-auxiliaires est un élément essentiel pour déterminer l'état initial des défenses immunitaires, comme pour suivre le cours de l'immunodéficience et contrôler la réponse au traitement.[1,2]

Principe du test

Le système Pima CD4 se compose d'une Pima CD4 test cartridge jetable et du Pima Analyser, et permet de déterminer la numération absolue de lymphocytes T auxiliaires dans le sang total. La Pima CD4 test cartridge jetable peut contenir jusqu'à 25 µL d'échantillon environ et contient les réactifs déshydratés nécessaires à la réalisation du test. Le Pima CD4 test s'effectue à l'intérieur de la Pima CD4 test cartridge et aucune partie du Pima Analyser n'entre en contact avec l'échantillon à aucun moment du processus de test. Cette disposition diminue le risque de contamination de l'Analyser et le transfert d'échantillons d'une mesure à l'autre. Après l'insertion de la Pima CD4 test cartridge dans l'Analyser, un mouvement péristaltique commence par transporter l'échantillon dans le compartiment d'incubation où l'échantillon se trouve en interaction avec des anticorps spécifiques marqués par deux colorants fluorescents différents émettant une lumière sur deux longueurs d'onde différentes (colorant 1 et colorant 2). L'un des anticorps est un anticorps monoclonal CD3 anti-humain conjugué au colorant 1. Le deuxième anticorps est un anticorps monoclonal CD4 anti-humain conjugué au colorant 2. Après un temps d'incubation donné, l'échantillon coloré est transféré dans le canal de détection de la cartouche. Le Pima Analyser est doté d'une fibre optique à fluorescence multicolore miniaturisée. Les signaux de fluorescence sont détectés par une caméra intégrée et analysés au moyen des algorithmes du logiciel propriétaire embarqué sur l'ordinateur incorporé. Les lymphocytes T auxiliaires présentent à la fois des antigènes de surface CD3 et CD4 et émettent donc un signal lumineux aux longueurs d'ondes spécifiques aux deux conjugués anticorps-colorant.
Ce procédé permet de différencier spécifiquement les lymphocytes T auxiliaires des autres types de cellules sanguines qui ne présentent qu'un seul des deux antigènes de surface. Le Pima Analyser affiche les résultats en cellules/µL. Les résultats sont également stockés dans une archive intégrée et sont assignés à un numéro d'échantillon (saisi par l'opérateur dans le Pima Analyser), avec la date/l'heure de réalisation du test. L'opérateur peut récupérer et télécharger les données à tout moment après le test. Une imprimante externe Pima Printer peut être branchée sur le port USB du Pima Analyser pour imprimer les résultats du test.

Contenu de l'emballage et stockage

Matériel fourni

Chaque boîte Pima CD4 contient:

- 25 cartouches en pochette individuelle (catalogue n°260100025) ou
  100 cartouches en pochette individuelle (catalogue n°260100100)
- 1 Manuel d'utilisation Pima™ CD4 cartridge

Stockage

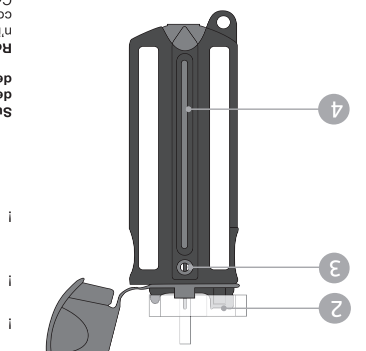
Stocker de 2 à 30°C

Matériel supplémentaire requis

- Pima Analyser
- Pipette volumétrique ou de transfert (pour les échantillons de sang veineux uniquement)
- Lancettes stériles*
  (pour les échantillons de sang capillaire)
  ** recommandation : Safety-Lancet Super, Sarstedt, Allemagne.*
  En cas d'utilisation d'autres lancettes, se reporter aux instructions spécifiques données par le fabricant.
- tampons imbibés d'alcool
- tampons secs
- pansements

Pima CD4 Test Cartridge

La Pima CD4 test cartridge est constituée d'une structure solide en plastique noir, d'un capuchon en plastique orange (1), d'un Sample Collector où appliquer l'échantillon sanguin (2), d'une fenêtre de contrôle pour vérifier que le volume d'échantillon est suffisant (3), d'un canal de détection avec un couvercle transparent (4), d'un tube en silicone situé à l'arrière pour permettre un mouvement du liquide dans la cartouche et d'un cache arrière orange (non représentés sur l'image).



Mises en garde

- ! **NE PAS** utiliser de gants talqués ou de main nue.
- ! Laisser la cartouche atteindre la température ambiante avant d'ouvrir la pochette en aluminium.
- ! **NE PAS** ouvrir la pochette en aluminium avant le moment du test.
- ! Sortir la cartouche de la pochette en aluminium avec soin, sans toucher le couvercle du canal de détection.
- ! **NE PAS** utiliser les cartouches ayant été mouillées.
- ! **NE PAS** utiliser les cartouches dont la pochette en aluminium est endommagée.
- ! **NE PAS** utiliser les cartouches après la date de péremption imprimée sur l'étiquette de la pochette.
- ! **NE PAS** retirer le Sample Collector avant que la fenêtre de contrôle ne soit remplie de sang.
- ! **NE PAS** tenter de séparer le bouchon en plastique orange de la base de la cartouche.
- ! **NE PAS** fermer le capuchon en plastique orange avant que la cartouche ne soit remplie de sang.
- ! **NE PAS** toucher le couvercle transparent du canal de détection. Tout dommage sur le couvercle du canal de détection peut entraîner un message d'erreur.
- ! **NE PAS** toucher ni tenter de tirer sur le tube en silicone. Tout dommage sur le tube peut entraîner un message d'erreur.
- ! **NE PAS** tenter de retirer le cache arrière orange de la cartouche.
- ! **NE PAS** ouvrir le sachet anti-condensation placé dans la pochette en aluminium.
- ! Veillez à bien Incinérer ou jeter tout déchet contaminé comme il convient, conformément aux réglementations nationales, régionales et locales.
- ! Afin de minimiser les erreurs d'identification d'échantillon, il faudra marquée chaque cartouche de l'identité d'échantillon correspondant sur la zone indiquée sur l'étiquette de la cartouche.

Suivre à la lettre la réglementation sur la prévention des infections pour l'utilisation de tous échantillons de sang et matériels relatifs.

Remarque: Le résidu blanc visible dans le capillaire EDTA n'indique **PAS** un défaut de la cartouche. Il s'agit d'une conséquence du processus de fabrication normal.
Ce résidu se dissout lorsqu'il entre en contact avec l'échantillon sanguin.

Prélèvement d'échantillon

Prélèvement capillaire de sang total[3]

(se reporter à l'illustration sur le déroulement)

1. Préparer le patient pour le prélèvement d'un échantillon capillaire (voir illustration n°4). Les meilleurs emplacements pour un prélèvement capillaire sont le 3e et le 4e doigts de la main non dominante. Ne pas utiliser le bout du doigt ni le centre de la pulpe. Éviter le côté du doigt, où on trouve moins de tissu mou, où se situent les vaisseaux et les nerfs et où l'os est plus près de la surface. La peau du 2e doigt (index) est en général plus épaisse, calleuse. Le 5e doigt comporte en général moins de tissu mou qui recouvre l'os. Éviter de piquer un doigt froid ou cyanosé, gonflé, présentant une cicatrice ou une éruption cutanée. Éviter les doigts portant une bague.
2. Réchauffer les doigts si nécessaire (voir illustration n°5). Demander au patient de laisser sa main tomber vers le bas pour accroître la circulation sanguine vers le doigt.
   Remarque : Veillez à ce que le patient soit toujours assis plus haut que la personne qui effectue le prélèvement capillaire.
3. Essuyer le bout du doigt choisi avec un tampon imbibé d'alcool et laisser sécher à l'air libre (voir l'illustration n°7).
4. Sortir une Pima CD4 test cartridge de sa pochette en aluminium et ouvrir entièrement le bouchon en plastique orange pour exposer entièrement le Sample Collector. Ajuster proprement le Sample Collector si nécessaire (voir illustration page 3). Conserver la pochette aluminium pour le cas où l'Analyser ne pourrait pas lire le code-barres de la cartouche.
5. Utiliser une lancette stérile pour effectuer une ponction au bord de la pulpe. Afin d'obtenir un échantillon de sang représentatif, un flux constant de sang est absolument nécessaire (voir illustration n°11 à 15). Si vous utilisez une lancette automatique, il est essentiel d'appuyer fermement la lancette sur le doigt et de maintenir le contact au moment de l'éjection de la lancette. Ne pas « presser » ou ne pas appliquer de pression forte répétée sur le doigt; cela pourrait conduire à une hémolyse ou à une contamination de l'échantillon par le liquide tissulaire. Si nécessaire, on peut masser légèrement le doigt pour assurer une bonne circulation sanguine.
6. Essuyer les premières gouttes de sang avec une compresse ou une gaze (voir illustration n°16 à 18). Vérifier que la circulation sanguine est suffisante pour générer des gouttes de sang assez grosses. Si nécessaire, essuyer à nouveau le doigt, jusqu'à ce que le sang s'écoule librement.
7. Laisser le sang s'écouler librement du doigt piqué directement sur le Sample Collector en maintenant la cartouche à un angle de 45 degrés pour le chargement de l'échantillon (voir illustrtion n°19). Attendre que le capillaire du Sample Collector soit complètement rempli de sang. Puis retirer la cartouche du doigt et laisser le patient appliquer une pression directe sur le côté de la plaie à l'aide d'un tampon sec et propre (voir illustration n°8 et 20).
8. Redresser la cartouche et observer par la fenêtre de contrôle pour vérifier que l'échantillon chargé est suffisant (voir l'illustration n°21). Il y a suffisamment de sang lorsque le capillaire que l'on voit par la fenêtre de contrôle est rempli de sang.
9. Pincer l'extrémité du Sample Collector des échantillons entre le pouce et l'index et l'extraire de la cartouche d'un seul mouvement continu vers le haut (voir l'illustration n°22).
   Jeter dans une poubelle biohazard.
10. Fermer complètement le capuchon en plastique orange (voir les illustrations n°23 à 25).
11. Il est recommandé d'insérer la cartouche de test dans le Pima Analyser immédiatement (en moins de 5 minutes) après avoir chargé un échantillon sanguin.
12. Appliquer un pansement sur le doigt du patient (voir illustration n°28).

Prélèvement par ponction veineuse de sang total[4]

1. Effectuer un prélèvement aseptique par ponction veineuse dans un tube de prélèvement sanguin EDTA (acide éthylènediaminetétracétique) stérile.
2. Retourner le tube de prélèvement 8 à 10 fois.
3. Stocker à température ambiante (18–28°C). L'échantillon doit être analysé dans les 36 heures qui suivent le prélèvement.
4. Avant de prendre un échantillon pour le tester, retourner le tube de prélèvement 10 à 15 fois pour que l'échantillon soit correctement mélangé.
5. Utiliser une pipette volumétrique ou de transfert pour appliquer l'échantillon sanguin dans le Sample Collector de la Pima CD4 test cartridge.
6. Suivre les instructions à partir du point 8 de la section précédente.

Procédure du test

1. Insérer l'échantillon dans la Pima CD4 test cartridge (pour plus de détails, voir la partie Prélèvement d'échantillon).
2. Sélectionner «Run Test» sur le Pima Analyser.
3. Insérer la Pima CD4 test cartridge dans le Pima Analyser dans le sens indiqué par la flèche sur la cartouche. Suivre les instructions à l'écran ou se reporter au manuel d'utilisation du Pima Analyser pour plus de détails sur la procédure d'analyse.
4. Retirer la Pima CD4 test cartridge lorsque l'Analyser vous y invite et lire le résultat.

Résultats

Les résultats sont calculés automatiquement par le Pima Analyser. Le comptage absolu de lymphocytes T auxiliaires s'affiche sur la première des quatre fenêtres de résultats de l'Analyser. L'opérateur a la possibilité d'imprimer un résultat sur le Pima Printer externe. Pour plus d'informations, se reporter au manuel d'utilisation du Pima Analyser.

Contrôle qualité et acceptabilité des résultats

Fonctions intégrées de contrôle qualité

La Pima CD4 test cartridge intègre des fonctions de contrôle pour vérifier le fonctionnement de l'Analyser et du réactif.
En outre, lorsqu'on insère la cartouche dans le Pima Analyser, le système effectue automatiquement les vérifications suivantes:

- **Date d'expiration:** Le code-barres linéaire inscrit sur la Pima CD4 test cartridge contient la date d'expiration, que le Pima Analyser vérifie avant l'analyse.
  Si la cartouche a passé la date d'expiration, l'analyse ne démarre pas et la cartouche est rejetée. Si le Pima Analyser ne parvient pas à lire le code-barres, l'opérateur peut saisir le code numérique manuellement. Ce code est imprimé sur la pochette de la cartouche, sous le code-barres linéaire.
- **Volume de l'échantillon:** Le Pima Analyser vérifie si la quantité d'échantillon, chargée dans la Pima CD4 test cartridge, est suffisante. Si cette quantité est insuffisante, l'analyse ne démarre pas et la cartouche est éjectée.
- **Validation du réactif:** La stabilité des réactifs est validée pour chaque Pima CD4 test cartridge grâce à un contrôle intégré du réactif. Si les résultats de ce contrôle sont en dehors des limites définies à la fabrication, l'Analyser affiche un message d'erreur.
- **Fonctionnement de l'instrument:** la fonction de contrôle fluorescent sur la Pima CD4 test cartridge est analysée pour vérifier le bon fonctionnement du Pima Analyser.

  Si les résultats du contrôle se situent en dehors des limites définies à la fabrication, l'Analyser affiche un message d'erreur.

Plusieurs autres vérifications sont effectuées au cours de l'analyse. Si les résultats d'une des vérifications posent un problème, le Pima Analyser affiche un message d'erreur. Pour le détail des messages d'erreur, se reporter au manuel d'utilisation du Pima Analyser.

Limites

1. Les résultats d'un Pima CD4 test doivent être évalués en contexte avec toutes les données cliniques et analytiques disponibles. Dans les cas où les résultats ne concorderaient pas avec l'évaluation clinique, il convient d'effectuer les tests supplémentaires appropriés.
2. Le Pima CD4 test a été évalué avec du sang total capillaire et veineux associés à l'EDTA comme anti-coagulant. Le sérum, le plasma et le sang total associés à d'autres anti-coagulants n'ont pas été évalués et ne doivent pas être utilisés.
3. Le comptage absolu de lymphocytes T-auxiliaires peut différer d'un laboratoire à l'autre selon les équipements utilisés.

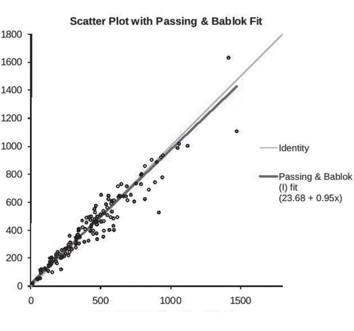
Caractéristiques de performance

Les caractéristiques de performance du Pima CD4 test ont été établies par des tests menés par Clondiag GmbH (aujourd'hui Alere Technologies GmbH) à Jena, en Allemagne et sur des sites cliniques externes en Afrique et en Allemagne.

Précision

La précision du Pima CD4 test pour le comptage absolu de lymphocytes T auxiliaires a été évaluée par comparaison avec le système BD FACSCalibur comme méthode de référence. On a prélevé des échantillons de sang total veineux sur 149 adultes séropositifs dans des établissements sanitaires en Ouganda et on les analysés avec le Pima CD4 test et avec la méthode de référence (mesure unique).
Une analyse par régression de Passing-Bablok a été effectuée sur la première mesure de comptage cellulaire Pima CD4 par rapport à la mesure BD FACSCalibur; les résultats sont illustrés dans le graphique ci-dessous.

La plage des échantillons analysés s'étendaient de 12 à 1472 cellules/µL pour le BD FACSCalibur et de 17 à 1631 pour le Pima CD4.
La pente (95% IC) était de 0,95 (de 0,91 à 0,99) avec une valeur d'interception (95 % IC) de 24 (de 8,5 à 37). Le coefficient de corrélation de Pearson (95 % IC) entre deux mesures était de 0,96 (de 0,94 à 0,97).



Une analyse de différence selon la méthode de Bland et Altman (Pima CD4 – BD FACSCalibur) a également été réalisée sur les données.
Le biais moyen (95 % IC) sur l'ensemble des 149 échantillons était de -10 (-22 à 3) cellules/µL.

Equivalence clinique

L'équivalence clinique des deux méthodes a été évaluée à partir d'un seuil diagnostic calculé à l'aide d'un tableau de contingence à 2x2 entrées. Les résultats obtenus sont illustrés dans les tableaux ci-dessous pour les deux seuils diagnostics de 200 cellules/µL et 350 cellules/µL, respectivement. Des écarts entre les méthodes de chacun des seuils de diagnostic ont été calculés en utilisant un test de McNemar et l'écart s'est révélé être insignifiant.

Equivalence clinique pour un seuil > 200			
	Valeur	95 % LCI	95 % UCI
Equivalence	0.953	0.906	0.981
	Pima négatif	Pima positif	
BD négatif	25	5	
BD positif	2	117	
Test de McNemar bilatéral (2 sur 7):			
Valeur p	0.453		
Équivalence clinique pour un seuil > 350			
	Valeur	95 % LCI	95 % UCI
Équivalence	0.940	0.888	0.972
	Pima négatif	Pima positif	
BD négatif	57	6	
BD positif	3	83	
Test de McNemar bilatéral (3 sur 9):			
Valeur p	0.508		

Analyse de précision des échantillons cliniques

L'écart-type propre à la méthode et le pourcentage CV des mesures Pima CD4 ont été calculés à partir des mesures dupliquées effectuées sur les 149 échantillons et pour des sous-ensembles d'échantillons compris dans les plages de dénombrement cellulaire 0–200, 0 –350 et >350, comme illustré dans le tableau suivant. La valeur MOYENNE correspond à la moyenne de toutes les mesures dupliquées au sein de chaque plage et la valeur ET correspond à la moyenne quadratique des écarts-types de toutes les mesures dupliquées au sein de chaque plage
(pour un intervalle de confiance IC de 95 %).

Plage de dénombrement (cellules/µL)	N	Moyenne (cellules/µL)	ET (cellules/µL)	LCI 95%	UCI 95%	%CV
0–200	29	119	20	16	27	16.6
0–350	59	198	23	19	28	11.6
>350	90	580	41	35	47	7.0

Sang total capillaire

Les performances de la méthode Pima CD4 sur des échantillons de sang total capillaire sont comparables à celles observées avec le sang total veineux. Des échantillons de sang provenant de 49 patients adultes séropositifs à VIH ont été recueillis dans deux établissements de santé en Allemagne. Le sang veineux des mêmes individus a été soumis à des tests de référence BD FACSCalibur.
Pour tous les échantillons analysés, la plage globale de dénombrement allait de 160 à 1181 cellules/µL pour BD FACSCalibur et de 167 à 1011 pour Pima CD4. Par comparaison avec BD FACSCalibur, l'analyse de régression présentait une pente (IC de 95%) de 0,85 (0,76 à 0,94) pour une valeur d'interception (IC de 95%) de 46,42 (-5,92 à 98,76).
Le coefficient de corrélation de Pearson (IC de 95 %) entre les deux mesures s'élevait à 0,94 (0,89 à 0,97).
Le %CV des mesures du Pima CD4 sur sang capillaire total était de 10,3.

Reproductibilité lot à lot

10 aliquotes de 2 échantillons de sang total en dessous et au-dessus du seuil de 350 cellules/µL ont été évaluées à l'aide de 3 lots de Pima CD4 cartridge différents.
La reproductibilité lot à lot est illustrée dans le tableau suivant:

Échantillon	Moyenne (cellules/µl)	% CV moyen
1	267	9,54
2	505	7,05

Réactivité croisée

L'anticorps CD4 réagit avec les monocytes ainsi qu'avec les lymphocytes T auxiliaires/inducteurs.[5,6] L'anticorps CD3 réagit avec tous les lymphocytes T matures.[7,8]

Linéarité

La linéarité a été évaluée en testant les dilutions progressives de 5 échantillons couvrant la plage clinique représentative des cellules T-auxiliaires dans le sang total. La méthode Pima CD4 a été prouvée linéaire de 3 à 2168 cellules/µL. Toutes les données corroborent la droite de régression linéaire avec une valeur R^2 minimale de 0,99.
Le tableau suivant récapitule les données:

Échantillon	Plage de dénombrement (cellules/µL)	Pente	R^2
1	3–2.168	1,00	1,000
2	4–1.507	0,99	0,995
3	4–690	1,02	0,996
4	4–402	1,01	0,997
5	9–391	0,98	0,997

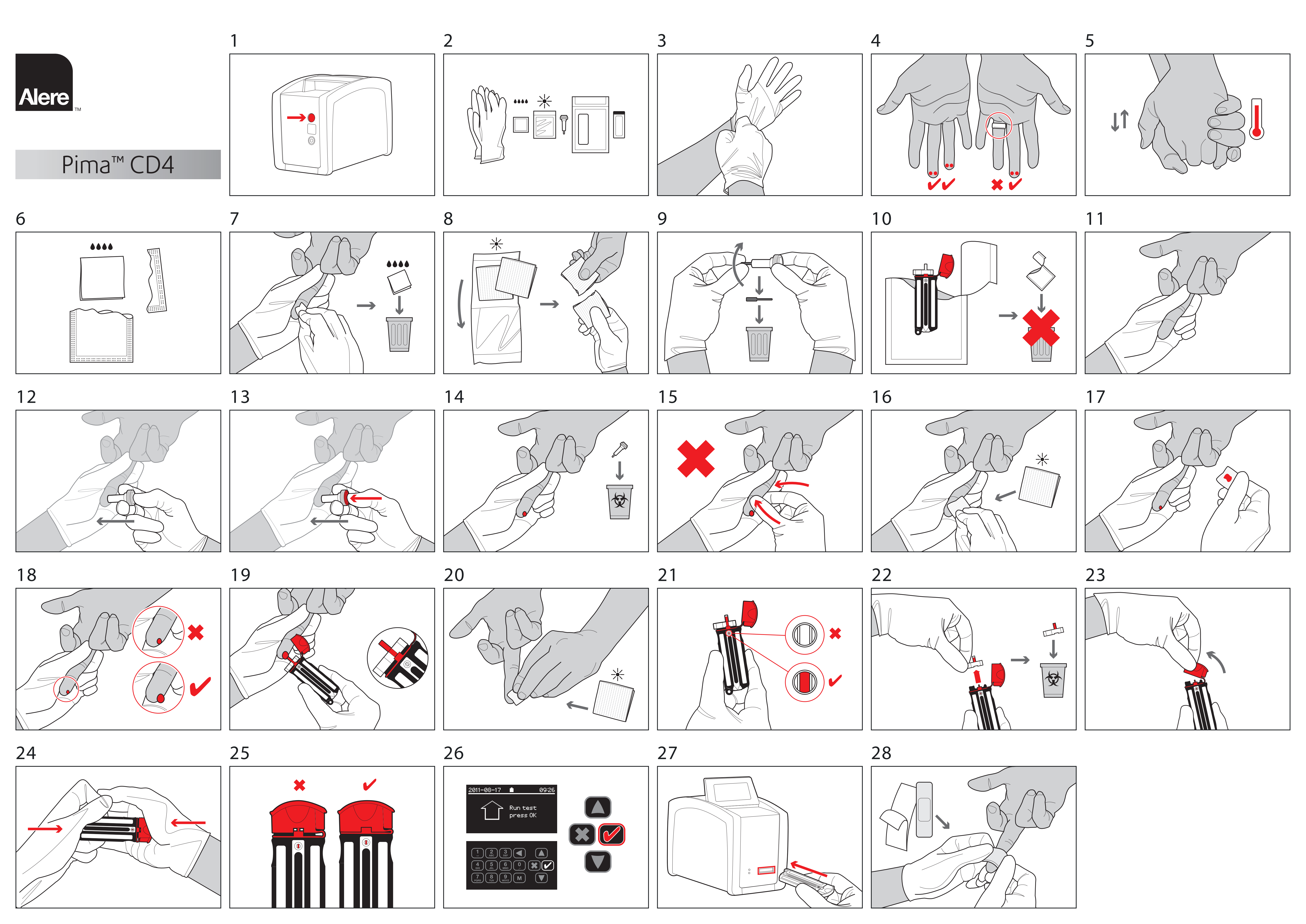
Références bibliographiques

1. Pattanapanyasat K and Thakar MR. CD4+T cell count as a tool to monitor HIV progression & anti-retroviral therapy. Indian J Med Res 2005; 121 : 539-49.
2. Rachlis AR and Zarowny DP. Guidelines for antiretroviral therapy for HIV infection. Canadian HIV Trials Network Antiretroviral Working Group. CMAJ 1998; 158 : 496-505.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures and Devices for the Collection of Diagnostic Capillary Blood Specimens; Approved Standard-6th Edition H04-A6 Vol.28 No 25.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard-6th Edition H03-A6 Vol.27 No 26.
5. HCDM (former HLDA VIII) Meeting May (2006), Quebec, Canada; WS Code M241.
6. Millan J, Cerny J, Horejsi V, Alonso MA (1999). CD4 segregates into specific detergent-resistant T-cell membrane microdomains. Tissue Antigens. Jan; 53(1) : 33-40.2.
7. Knapp, W., B. Dorken, et al. Eds. (1989), Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens Oxford University Press. New York.
8. Mc Michael, A.J., P.C.L. Beverly, et al. eds. (1987). Leucocyte Typing III: White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press. New York.

Index des symboles

- CE — Marquage CE
- IVD — Dispositif médical de diagnostic in vitro
- Se reporter au mode d'emploi
- REF — Référence catalogue
- LOT — Numéro de LOT
-  Date de péremption
-  Fabricant
-  Avertissement
- Ne pas réutiliser
-  Contient du matériel en quantité suffisante pour <n> tests
-  2°C 30°C Limites de température
-  Tenir au sec

Avertissement: les cartouches Pima CD4 renferment de petites quantités de préparations à base de cellules sanguines humaines. Ces préparations cellulaires ont été testées comme non-réactives aux anticorps suivants : Anti-HCV, Anti-HIV1 et 2, HBsAg, Anti-HBc (IgG, IgM), Syphilis, AK irrégulier, HCV- et HIV-PCR. Un risque d'infection résiduel minime subsiste.



Alere™
Pima™ CD4
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
2011-08-17
09:26
Run test
press OK
27
28